

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
1 de Noviembre de 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/81615 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12Q 1/04 //
(C12Q 1/04, C12R 1:19, 1:22, 1:37, 1:385, 1:42)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): QUE-
SADA MUÑOZ, Vivian de Jesús [CU/CU]; Calle 22
No.1104 entre 17 y Final, Quivicán, Provincia la Habana
(CU). RODRIGUEZ MARTINEZ, Claudio [CU/CU];
Edificio 2, Apto. 3, Comunidad Científica Bejucal,
Provincia la Habana (CU).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU01/00002

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de Abril de 2001 (17.04.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga, Lidia; Lex,
S.A., Ave. Ira No. 1001, Esq. 10, Miramar, Playa, C.
Habana 11300 (CU).

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
83/2000 18 de Abril de 2000 (18.04.2000) CU

(81) Estados designados (nacional): BR, CA, JP, MX, RU, US.

(84) Estados designados (regional): patente europea (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS
[CU/CU]; Carretera Beltrán Km 1 1/2, Bejucal, Provincia
la Habana 6048 (CU).

Publicada:
con informe de búsqueda internacional

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR DETECTING AND EARLY AND DIFFERENTIATED COUNTING OF
GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS

(54) Título: COMPOSICION Y METODO PARA LA DETECCION Y EL RECUEENTO TEMPRANO Y DIFERENCIADO DE
MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS

(57) Abstract: The invention concerns the field of microbiology, more particularly, a composition and a method for the detection, identification and early counting of microscopic organisms, more specifically gram-negative microorganisms. The composition described in the invention consists of a mixture of protein substances, with a total nitrogen content of between 9 and 20 % and a ratio of 2:1 and 24:1 in relation to the content of gram-negative microorganism inhibitors used in said mixture. The composition also contains a mixture of organic and inorganic substances facilitating differentiation of gram-negative microorganisms, said mixture having a ratio of between 0.5: 1 and 2:1 relative to the mixture of protein substances. Said composition makes it possible to perform detection and differentiated counting of *E. coli* and other coliform organisms due to the blue-green color of their colonies on an orange background of the medium; *Salmonella non typhi* owing to the red color of the center of the colonies on a pink background of the medium; *Salmonella typhi* and *Proteus* due to the transparency of the colonies; *Citrobacter* and *Klebsiella* owing to the violet coloring of the colonies on a pink to orange background of the medium, and *Pseudomonas aeruginosa* due to the orange coloring and dark center of the colonies and greenish pigmentation after 24 hours of incubation, which emit yellow-greenish fluorescence under ultraviolet light.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el campo de la Microbiología y en particular con una composición y un método para la detección, identificación, diferenciación y recuento temprano de organismos microscópicos, concretamente microorganismos Gram-negativos. La composición descrita en la invención consiste en una mezcla de sustancias de origen proteico, con un contenido de nitrógeno total entre un 9 y un 20 %, la cual se encuentra en una relación entre 2:1 y 24:1 con respecto al contenido de inhibidores de los organismos Gram-positivos empleados en la misma. Contiene además una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas que facilitan la diferenciación de los organismos Gram-negativos, estando dicha mezcla en una a relación entre 0.5:1 y 2:1 con respecto a la mezcla de sustancias de origen proteico. La referida composición permite la detección y recuento diferenciado de *E. coli* y otros organismos coliformes, debido al color azul-verde de sus colonias sobre fondo naranja del medio; *Salmonella non typhi* por el color rojo del centro de las colonias sobre el fondo rosado del medio; *Salmonella typhi* y *Proteus* por la transparencia de las colonias; *Citrobacter* y *Klebsiella* por la coloración violeta de las colonias sobre fondo rosado a naranja del medio; y *Pseudomonas aeruginosa* por la coloración naranja con centro oscuro de las colonias y pigmentación verdosa a partir de las 24 horas de incubación, las cuales emiten fluorescencia amarillo-verdosa bajo luz ultravioleta.

WO 01/81615 A1

WO 01/81615 A1



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y EL RECuento TEMPRANO Y DIFERENCIADO DE MICROORGANISMOS GRAM- NEGATIVOS.

5 Sector Técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la Microbiología y particularmente con una composición y un método empleados para la detección, identificación, diferenciación y recuento temprano de organismos microscópicos, concretamente microorganismos Gram-negativos.

10 Técnica anterior

La recuperación, identificación y recuento de microorganismos Gram-negativos, tales como *Salmonella*, *E. coli* y coliformes, reviste un gran interés desde el punto de vista del diagnóstico clínico y en el control de la calidad higiénico-sanitario de aguas, alimentos y muestras ambientales.

- 15 Para la identificación y el recuento de los organismos microscópicos Gram-negativos existe una gama de medios de cultivo con formulaciones "tradicionales", muchas de ellas desarrolladas desde el pasado siglo. Dentro de estos medios se pueden señalar el Agar S.S., el Agar S.S. modificado, el medio XLD, el Agar Entérico de Hektoen, Agar de Kristensen y el Agar Verde Brillante 1,
20 2, empleados para la identificación de *Salmonella* (Soria Melquizo, F. Difco Handbook. Tenth edition. 1984; MERCK Handbook of Culture Media. 1990; OXOID Handbook of Culture Media. 1995).

Estos medios en general tienen como inconveniente que son inhibidores para un gran número de enterobacterias, e incluso el crecimiento de *Salmonella* se ve
25 algo inhibido por el empleo de concentraciones de inhibidores que superan el poder promotor de crecimiento de los nutrientes que ellos contienen.

Algunos de los medios de cultivo previamente referidos basan la identificación de *Salmonella* en la producción de H_2S , característica propia además de otros organismos Gram-negativos como *Proteus* y *Citrobacter*.

- 30 Otros medios han sido ampliamente comercializados para la identificación y el recuento de *E. coli* y coliformes en diferentes muestras biológicas, dentro de ellos se destacan el Agar Endo, Agar Eosina Azul de Metileno, Agar de MacConkey,

Agar Violeta Rojo Bilis, entre otros (Soria Melquizo, F. Difco Handbook. Tenth edition. 1984; MERCK Handbook of Culture Media. 1990; OXOID Handbook of Culture Media. 1995).

Estos medios, por lo general, contienen igualmente inhibidores de organismos Gram-positivos que, por no encontrarse en proporciones adecuadas con respecto a los nutrientes, con frecuencia inhiben el crecimiento de los microorganismos de interés. Por otra parte no es posible identificar en ellos las *Salmonellas* ni los fermentadores tardíos de la lactosa.

En general, la especificidad y/o sensibilidad diagnóstica de estos medios no es elevada, ya que basan su identificación en reacciones bioquímicas de fermentación de carbohidratos, que son comunes a varias especies o géneros dentro de los organismos de interés, tal es el caso de la degradación de la lactosa por el grupo coliformes (no todos la fermentan).

En 1998 Helena Tuompo y colaboradores patentaron un método y un medio de cultivo para la identificación de *Salmonella* (Patente No. US 5, 786, 167), basada en la habilidad de la *Salmonella* de metabolizar melibiosa, manitol y sorbitol, y la inclusión de un sustrato cromogénico para detectar actividad β -galactosidasa.

Este medio no permite identificar especies de *Proteus*, una enterobacteria de interés sanitario, ya que dicho microorganismo crece como colonias incoloras.

Otro inconveniente de este medio es que no posibilita el recuento de enterobacterias. Las salmonellas pueden confundirse con las shigellas fermentadoras del manitol, tales como *S. sonnei* y *S. flexneri*.

Ese mismo año Alain Rambach patentó un medio de cultivo cromogénico-fluorogénico para la detección de *E. coli* y el método para su empleo (Patente No. US 5, 846, 761). La invención consiste en utilizar un derivado del ácido indolil-glucurónido o sus sales, y un sustrato no cromogénico de derivados alquil, -alkenil o -aril del ácido glucurónido o de sus sales.

Este medio es específico para *E. coli* y no permite la identificación y/o recuento de *Salmonella* y de otros organismos microscópicos Gram-negativos. Por otra parte requiere del empleo de una lámpara de luz ultravioleta, lo que hace engorroso el recuento.

En la patente No. US 5, 723,308, se describe por Mach y colaboradores un

medio para el recuento rápido de bacterias coliformes. El medio comprende una mezcla de peptona de gelatina y extracto de levadura, lactosa o glucosa, cloruro de sodio, sales biliares, goma arábica e indicadores de pH como el rojo fenol y sulfonftaleína en cantidades desde 0,16 a 5 g/L para identificar las bacterias, pero
5 estas altas concentraciones de indicadores son inhibitorias, lo que ocasiona recuentos inferiores. El principio de la fermentación de azúcares, específicamente la lactosa por los organismos coliformes sigue siendo el utilizado en este medio, con la desventaja de no detectar los fermentadores tardíos como por ejemplo *Citrobacter*. Otros microorganismos pertenecientes a las enterobacterias no se
10 identifican y también pueden estar afectadas por las altas concentraciones de indicadores.

En 1993 Christopher Tate y colaboradores patentaron un medio muy selectivo para *Salmonella* (Patente de No. US 5, 208, 150) con inclusión de Tergitol RTM en una base de xilosa-lisina, donde se incluye además sulfapiridina para inhibir el
15 crecimiento de *Citrobacter*. Al igual que en la mayoría de los medios que se han analizado y que existen en el mercado para la identificación de *Salmonella*, el problema se soluciona con la inhibición de la flora que puede ser confundida con *Salmonella*, principalmente *Proteus* y *Citrobacter*, estos pertenecientes a las enterobacterias y, específicamente *Citrobacter* se considera un coliforme, por
20 tanto el recuento de los mismos se ve afectado en este medio. El uso de un antibiótico en el medio, como es el caso de la novobiocina, trae inconvenientes en cuanto a la preparación y necesita cuidados adicionales en cuanto a esterilización y conservación del medio.

Alain Rambach patentó un medio para el aislamiento e identificación de
25 *Salmonella* (Patente No. US 5, 194, 374) que se puede considerar el prototipo más cercano a la presente invención y consiste en que la identificación de ese organismo se efectúa mediante la reacción de descomposición del 1,2-propanodiol en presencia de un indicador de pH que es adsorbido en un material en forma de polvo, con un tamaño de 100 micras. Dicho material es sílica,
30 sílicagel o celulosa. Además de otros componentes, se emplea un sustrato para la β -galactosidasa, IPTG y desoxicolatos.

El medio presenta las siguientes desventajas:

- No todas las *Salmonellas* "no typhi" dan coloración roja, pues según reportes de Monget-Daniel (Patente No. US 5, 434, 056), una cepa de cada una de las *Salmonella enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. paratyphi* A ensayadas por él, resultaron incoloras, y una cepa de *S. Arizonae* desarrolló color azul.
- 5 - Una cepa de *Klebsiella pneumoniae* presentó una coloración azul en experiencias realizadas en el laboratorio, cuando la reacción esperada debía ser violeta, pues este organismo metaboliza el 1,2 propanodiol y es β -galactosidasa positivo, la mayoría de las cepas de este organismo revelan la coloración azul después de 24 horas.
- 10 - En experimentos llevados a cabo en el desarrollo de la presente invención se corroboran los resultados de Monget, encontrando algunas cepas de *Pseudomonas* de color rojo, característico también de *Salmonella*.
 - Se detectó también coloración azul no esperada en cepas de *Proteus vulgaris*.
 - El medio no está diseñado para el recuento de los organismos debido
 - 15 fundamentalmente a que la composición de los nutrientes que posee no cuenta con los nutrientes necesarios para sobrepasar el poder inhibitorio de los desoxicolatos incluidos en la formulación. Igualmente, la relación total de nutrientes con respecto a los inhibidores es insuficiente y no permite un adecuado desarrollo de los organismos Gram-negativos que al final impide un recuento
 - 20 seguro de los mismos.
 - La anterior deficiencia incide además en que para emplear el medio de Rambach para identificar *Salmonela* se necesite incubar la muestra en medios de pre-enriquecimiento o enriquecimiento antes de ser inoculadas en él. Por lo general el período de enriquecimiento se extiende por 18-24 horas en Caldo
 - 25 Selenito, Tetracionato o Rappaport Vassiliadis
 - En experiencias realizadas por el solicitante, la cepa de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 resultaron muy inhibidas en el medio después de incubarlas de 18 a 24 horas a temperatura de 37 °C. *Proteus vulgaris* ATCC 13315 y *Proteus mirabilis* ATCC 7002 no crecieron en el
 - 30 mismo experimento. En otras dos experiencias *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, no creció en el medio en comparación con medios experimentales.
 - Otra d sventaja es la cantidad de silicagel pulverizada que posee el medio,

difícil de distribuir homogéneamente y que flocula con mucha facilidad, provocando en muchos casos que la consistencia del medio no sea la adecuada y la manipulación resulta engorrosa.

- La alta capacidad de adsorción de la sílica impide la difusión de los componentes adsorbidos al medio.
- El pobre poder de promoción del crecimiento alcanza incluso a las salmonelas, pues en experiencias realizadas una cepa de *Salmonella typhi* resultó inhibida en el medio.
- La relación entre inhibidores, nutrientes y las sustancias reveladoras no es la más apropiada ya que se hace necesaria la inclusión de activadores de las enzimas (IPTG) en la fórmula, para poder metabolizar los sustratos y revelar la reacción en menos tiempo.

Divulgación de la Invención

El objetivo de la presente invención consiste en proveer una composición para la detección temprana y el recuento diferenciado de organismos microscópicos Gram-negativos, permitiendo específicamente identificar y realizar un recuento seguro y al unísono de *Salmonella*, *E. coli*, coliformes y otras bacterias Gram-negativas tales como: *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Klebsiella* en períodos tempranos de cultivo y con una alta sensibilidad analítica.

La novedad de la solución radica en que se conforman mezclas de sustancias de origen proteico altamente nutritivas, con un alto contenido de nitrógeno total, entre el 10 y el 33 % y que dicha mezcla se encuentra en una relación de 2:1 a 24:1 con respecto al contenido en la formulación de sustancias que inhiben el crecimiento de los organismos que se desean inhibir, y más específicamente, los Gram-positivos.

Por otra parte, en la composición se incluyen mezclas de sustancias de naturaleza orgánica e inorgánica que permiten diferenciar y hacer un recuento diferenciado de los organismos microscópicos de interés, encontrándose esta mezcla en una relación adecuada de 0,5:1 a 2:1 con respecto a la mezcla de sustancias nutritivas de origen proteico antes mencionadas.

Las sustancias de origen proteico son seleccionadas entre varios tipos de compuestos entre los que se destacan:

- Hidrolizados pancreáticos o papáinicos de corazón de res deshidratados con un contenido de nitrógeno total de 10 a 15 %, y que se encuentran en la mezcla de sustancias de origen proteico en concentraciones entre el 25 y el 75%.
- Hidrolizados enzimáticos deshidratados de proteínas lácteas con un contenido de nitrógeno total de 11 a 20 %, encontrándose en concentraciones de hasta el 15 % de dicha mezcla de sustancias proteicas.
- Autolizados o hidrolizados enzimáticos de origen microbiano, con un contenido de nitrógeno total de 8 a 15 % y que se encuentran en dicha mezcla en concentraciones del 15 al 25 %.
- Mezclas de proteínas de la yema del huevo, con un contenido de nitrógeno total del 15 al 33 %, encontrándose en la mezcla de sustancias de origen proteico en concentraciones de hasta el 45 % de dicha mezcla.

La composición propuesta en la presente invención incluye el empleo de pequeñas cantidades de inhibidores del crecimiento de los organismos microscópicos Gram-positivos, entre los que se encuentran los ácidos cólico y desoxicólico, así como las sales biliares, lo cuales se emplean en la composición en una relación entre el 0.5:1 hasta 2:1 con respecto a la mezcla de sustancias de origen proteico, es decir en cantidades entre 0,8 a 4 g/L.

Por otra parte, un aspecto novedoso de la presente invención consiste en el empleo, conjuntamente con los componentes antes mencionados, de otros compuestos que permiten la diferenciación selectiva de los organismos de interés, seleccionados entre los óxidos de metales bivalentes y compuestos de silicio, tales como $3\text{MgO} \times 4\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ y SiO_2 en cantidades de 2 a 20 g/L, es decir, a concentraciones entre el 6 y el 32% con respecto a la masa total de la mezcla, así como el rojo fenol y el rojo neutro en cantidades de 0,01 a 0,06 g/L (concentraciones entre 0.03 a 0.18% de la masa total), en presencia de alcoholes degradables por las enzimas de alguno de los organismos a detectar, preferiblemente $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ en cantidades de 10 a 14 mL/L, y la presencia de compuestos cromogénicos degradables por otros organismos microscópicos diferentes a aquellos que degradan los alcoholes, y que al ser degradados, le otorgan a las colonias una coloración diferente a las de los organismos que degradan el alcohol, preferiblemente el X-gal en cantidades de 0,05 a 0,1 g/L, es

decir, a concentraciones entre el 0.15 y el 0.3% de la masa total de dicha mezcla . Otro elemento novedoso en la formulación para este tipo de medios con la finalidad propuesta, se incluye la combinación de sales de sodio y magnesio, tales como cloruro de magnesio y carbonato de sodio, en cantidades de 0,01 a 10 g/L es decir a concentraciones que van desde 0.03% al 32% de la masa total de la mezcla, la creatina y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular en cantidades hasta 1 g/L (hasta 3% de la masa total de la mezcla), aminoácidos sulfurados, tales como cistina y cisteína en cantidades hasta 0,4 g/L (hasta 1.25% de la masa total de la mezcla).

- 10 En la composición se incluyen agentes gelificantes, preferiblemente agar con una dureza entre 400 y 700 g/cm² en cantidades de 13 a 20 g/L (entre 40 y 63% de la masa total de la mezcla).

La composición para ser utilizada se reconstituye en agua a razón de 30 a 32 g/L, para lo cual, se adiciona el alcohol al agua, agitando hasta lograr la total distribución, adicionando a la premezcla los demás ingredientes, agitando a temperatura de 100 °C por 1 a 3 minutos y disminuyendo la temperatura hasta 45-50 °C. Dicha nueva composición tiene un pH de 6,8 a 7,4 después de ebulir por 1-15 minutos y enfriar hasta 20-25 °C. La composición se emplea incubándola en forma de gel a temperatura de 30 a 45 °C por espacio de al menos 12 horas.

- 20 En dicha composición preparada y restituida en agua, es posible proporcionar un nuevo método para la detección temprana y el conteo diferencial de organismos microscópicos Gram-negativos tales como *Salmonella*, *E. coli* y otros organismos coliformes. Por ejemplo, *E. coli* y coliformes muestran una coloración azul-verdosa de la colonia sobre un fondo naranja del medio, *Salmonella* (no typhi) puede detectarse por el color rojo del centro de las colonias sobre un fondo rosado. *Salmonella typhi* y *Proteus vulgaris* son detectados por la transparencia de las colonias, *Citrobacter* y *Klebsiella* se diferencian por la coloración violeta de las colonias sobre el fondo rosado o naranja del medio, *Pseudomonas aeruginosa* por la coloración naranja clara con centro más oscuro de la colonia, tornándose verdosa después de 24 horas y presentando fluorescencia amarilla-verdosa bajo luz ultravioleta.

Las ventajas de la nueva invención radican en que:

- Por primera vez se proporciona una composición que permite la detección y numeración temprana y diferenciada de varias especies y géneros de organismos microscópicos Gram-negativos, entre ellos *Salmonella typhi* y *no typhi*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Citrobacter* y *Pseudomonas*.
- 5 - El balance entre las bases nutritivas, con un contenido adecuado de nitrógeno total, la relación entre ellas, y con respecto a los inhibidores, posibilita que los organismos de interés crezcan sin inhibición, especialmente *Salmonella*, y que los organismos Gram-positivos sí estén totalmente inhibidos.
- La especificidad diagnóstica de la composición es muy elevada, para los
10 organismos de interés, pues en todas las experiencias realizadas ha resultado del 100 % para todos los organismos.
- De manera inesperada, se ha posibilitado el aislamiento identificación de *Salmonella* en solo 12 horas, sin necesidad de pre-enriquecer o enriquecer la muestra previamente.
- 15 - La sensibilidad analítica es muy alta, incluso tempranamente, o sea, antes de las 24 horas para todos los organismos de interés.
- Con la composición se logran identificar y enumerar tempranamente organismos fermentadores tardíos de lactosa, tales como *Citrobacter* y *Serratia*, que pueden ser enumerados e identificados como coliformes.
- 20 - Es de sumo interés el hecho que de manera inesperada los *Proteus*, organismos de interés sanitario no pertenecientes a los coliformes pero sí a las enterobacterias, así como *Salmonella typhi*, otra bacteria Gram-negativa, crecen en el medio y se presentan como incoloros, por lo que su presencia, no interfiere en el recuento de los coliformes, y de esta forma, están disponibles para una
25 sucesiva identificación.
- Se ha logrado enumerar diferenciadamente las especies de *Salmonella* de las *Shigellas* fermentadoras del manitol, tales como, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*.
- Debido al balance logrado en la formulación propuesta entre inhibidores, bases
30 nutritivas y las demás sustancias favorecedoras del crecimiento, y su relación con los sustratos que permiten la identificación diferenciada de los organismos de interés, se hace posible utilizar bajas concentraciones de los indicadores o

reveladores de la reacción (0,01 a 0,06 g/L), lo que intensifica las cualidades promotoras o nutricionales del producto.

- Las bajas concentraciones de los indicadores, son suficientes para identificar los organismos de interés, con el consecuente ahorro de estas sustancias de difícil obtención por síntesis.

- Las sustancias que conforman la composición son termoestables, por lo que ninguna complica la preparación del medio final, e incluso, posibilitan disponer del diagnosticador, sin necesidad de esterilizarlo.

- Las reacciones que permiten la identificación de los organismos de interés en la presente composición son claras y comunes para las cepas de cada género o especie a identificar, por lo que no se han detectado respuestas "atípicas" ni con *Salmonella* ni con el resto de las enterobacterias, incluyendo los coliformes.

- Sorprendentemente, las cepas de *Klebsiella* al emplear la solución propuesta, dan una respuesta diferente al resto de las enterobacterias, excepto *Citrobacter*, lo que brinda una nueva posibilidad diagnóstica, pues se puede hacer un recuento presuntivo de estos dos gérmenes cuando se requiera.

- Con la presente invención, se logra una considerable reducción del tiempo total del ensayo, que para el caso de *E. coli*, se logra en menos de 12 horas en determinadas aplicaciones.

- El producto no contiene sustancias de difícil distribución o disolución, ni componentes incompatibles, lo que hace sencilla su preparación.

- La conjunción de diferentes fuentes de proteínas, especialmente seleccionadas y sus derivados de la hidrólisis, con un contenido de nitrógeno del 8 al 33 %, proporciona nutrientes suficientes como que para todos los géneros y especies de interés, se desarrollen sin inhibición en un corto período de tiempo. La presencia de otros componentes, tales como vitaminas y microelementos favorece este balance.

- La invención, al proveer una relación entre los componentes de naturaleza orgánica e inorgánica, así como de las sustancias de origen proteico entre 0,5:1 a 2:1, posibilita la diferenciación de los organismos de interés, permitiendo que crezcan los organismos de fácil inhibición por el grupo de compuestos del ácido cólico y desoxicólico y de difícil diferenciación por los métodos tradicionales de

degradación de azúcares.

- La adición de óxidos de metales bivalentes y de silicio en cantidades de 2 a 20 g/ L, además de activar el metabolismo microbiano, permiten la conformación de una estructura sólida, que conjuntamente con el agar de la dureza seleccionada
5 (400-700 g/cm²), permiten la formación de colonias características, de las cuales no difunde al medio su coloración, lo que finalmente posibilita la diferenciación simultánea por colores de una amplia gama de organismos microscópicos.
- La mezcla de proteínas del huevo, además de aportar nutrientes, posibilita, conjuntamente con las sustancias mencionadas en el párrafo anterior, una zona
10 de contraste en todo el volumen del medio, lo que adyuva la apreciación de las diferentes coloraciones y tonalidades de las colonias.
- La combinación de alcoholes degradables por las enzimas de, al menos, uno de los organismos a identificar en las cantidades establecidas de los indicadores de pH y del X -gal posibilitan que, a altas diluciones de la muestra y a pocas horas
15 del inicio del cultivo (menos de 12 horas para *E. coli* y alrededor de 12 horas para *Salmonella* y bacterias coliformes) se puedan observar las reacciones que permitan la identificación certera y segura, posibilitando la alta sensibilidad y especificidad del diagnosticador.
- Las sales de sodio y magnesio en las cantidades previstas, permiten acelerar
20 las reacciones enzimáticas, las que, conjuntamente con otros compuestos como la creatina y otros aminoácidos sulfurados, brindan nutrientes adicionales para aquellos organismos de interés que son susceptibles a ser inhibidos por los compuestos del ácido cólico y desoxicólico.
- Las cantidades en que se restituye la composición en agua, así como el método
25 de preparación e incubación de las muestras, proveen de un procedimiento fácil, sencillo y seguro para el laboratorista que brinda una confiabilidad superior a la práctica diagnóstica.
- La posibilidad que brinda la composición propuesta, de identificar los organismos microscópicos sólo por sus características cromáticas peculiares,
30 permite la lectura e identificación de los resultados por un personal con un mínimo de preparación.

Descripción detallada de la invención

Para la conformación de la composición, los componentes se preparan según su estado físico: sólido o líquido. La preparación de los componentes sólidos o polvos se describe a continuación:

- 5 Las sustancias de origen proteico seleccionadas dentro del grupo de hidrolizados pancreáticos o papaínicos de corazón de res con un contenido de nitrógeno total entre 9 y 14 % y en una cantidad de 25 a 77 %, respecto a la masa de su mezcla; hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas con un contenido de nitrógeno total de 9 a 20 %, y en una cantidad de 0 a 15 % respecto a la masa de su mezcla, así
- 10 como, las proteínas del huevo, con un contenido de nitrógeno total de 5 a 7 % y en una cantidad de 0 a 45 % respecto a la masa de su mezcla; se tamizan para lograr la uniformidad del tamaño de partículas.

Dichas sustancias de origen proteico están en una relación de 2:1 a 24:1 con respecto al contenido de inhibidores, seleccionados dentro del grupo del ácido

- 15 cólico y desoxicólico (sales biliares, desoxicolato de sodio), los cuales igualmente son tamizados, quedando listos para ser mezclados y homogeneizados, con el resto de los componentes orgánicos e inorgánicos que se adicionan en relación de 0,5:1 a 2:1, respecto a la masa de la mezcla de sustancias de origen proteico.

Se realiza una premezcla compuesta por: óxidos de metales bivalentes y/o

- 20 compuestos del silicio ($3\text{MgO} \times 4\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$; $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$), previamente secadas y en cantidades entre 6 y 32 % respecto a la mezcla final; indicadores de pH, preferiblemente rojo fenol y rojo neutro en cantidades de 0,03 a 0,18 % respecto a la mezcla total; compuestos cromogénicos degradables bajo la acción de, al menos, un organismo, preferiblemente X-gal, en cantidades de 0,15 a 0,3 %,
 - 25 respecto a la mezcla total. La premezcla de estos compuestos se puede molinar y se tamizan previo a su homogeneización de manera tal, que pesando la suma de la cantidad de cada componente en la formulación, se logre una distribución adecuada de cada uno.

Las sales de sodio (carbonato de sodio) y de magnesio (cloruro de magnesio)

- 30 previamente se secan, molinan y tamizan antes de agregarlas a la mezcla final en cantidades de 0,03 a 32 %.

Los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, específicamente creatina,

(hasta un 3 % respecto a la mezcla final) y los aminoácidos sulfurados, preferiblemente cistina y cisteína (hasta un 1,25 % respecto a la mezcla final) se tamizan antes de agregarlos a la mezcla total.

El agente gelificante, preferiblemente agar, de dureza entre 400 y 700 g/cm² que se utiliza en cantidades entre el 40 y 67 % respecto a la mezcla final, se seca y tamiza antes de agregarlo a la mezcla total.

Todos los componentes antes mencionados, así como la premezcla, se unen y homogenizan hasta lograr un contenido uniforme con un pH de 6,8 a 7,4. Dicha mezcla se envasa en frascos herméticamente cerrados, protegidos de la luz, manteniéndolos a temperatura ambiente.

Los componentes líquidos que pueden ser los polialcoholes, específicamente el C₃H₈O₂, y las proteínas del huevo sin deshidratar, así como el agua destilada o desionizada, se mezclan bien hasta lograr una solución homogénea.

El polvo se adiciona en cantidades de 30 a 32 g/L a la mezcla líquida, de esta manera se restituye y se obtiene la suspensión de la composición.

La composición puede prepararse a escala de laboratorio, pesando los componentes por separado dentro de un contenedor y manteniendo las proporciones antes mencionadas. Se adiciona posteriormente la mezcla líquida sobre la mezcla de polvos. La suspensión se agita y deja remojar al menos 10 minutos antes de ebulir por espacio de 1 a 3 minutos. Se enfría hasta 45-50 °C y se distribuye en el envase final del ensayo, dejándolo solidificar a temperatura entre 25 y 30 °C. Si se observa humedad en las tapas de los contenedores, una vez gelificado el contenido, se debe secar por cualquiera de los métodos conocidos, antes de inocular los organismos microscópicos o las muestras que los contengan, por métodos de siembra en estría en cualquiera de sus formas, o por diluciones en cualquiera de sus modos. Los recipientes inoculados se incuban a temperatura de 30 a 45 °C por al menos 12 horas.

La lectura de los resultados se realiza observando el color y morfología de las colonias aisladas en la superficie, de manera que la observación de colonias azul-verde con centro más oscuro, sobre fondo naranja del medio, bordes regulares y un tamaño de 1 a 5 mm, en dependencia del tiempo de incubación, es característico de *E. coli* y coliformes, excepto los géneros *Citrobacter* y *Klebsiella*,

los cuales se observan semejantes pero con coloración violeta sobre fondo rosado a naranja del medio.

Las especies de *Salmonella no typhi* se observan de color rosado a rojo, sobre fondo rosado del medio, bordes regulares, de 1 a 6 mm, en dependencia del tiempo de incubación. Las colonias de *Salmonella typhi* y *Proteus* se observan del color del medio por la transparencia de éstas, bordes regulares y tamaño de 1 a 3 mm, en dependencia del tiempo de incubación.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se observan con una coloración naranja con centro oscuro, bordes algo irregulares y pigmentación verdosa a partir de las 24 horas de incubación, emitiendo fluorescencia amarillo-verdosa bajo luz ultravioleta (365 nm). Otros organismos Gram-negativos permanecen incoloros en el medio.

Ejemplos de Realización.

Ejemplo No. 1

Se prepararon 400 g de la composición deshidratada en polvo con la siguiente composición:

COMPONENTE	g/400 g de medio
Hidrolizado pancreático de corazón de res (nitrógeno total $\approx 10\%$)	63
Hidrolizado enzimático de proteínas lácteas (nitrógeno total $\approx 12\%$)	38
Hidrolizado de levadura <i>Saccharomyces</i> (nitrógeno total $\approx 8\%$)	38

Dichos componentes fueron previamente tamizados.

En la composición se incluyeron las sales biliares en calidad de inhibidores (16,6 g).

Se preparó una premezcla de 51 g de $3\text{MgO} \times 4\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, con 1 g de X-gal y 0,4 g de rojo neutro. Con posterioridad se mezclaron todos los ingredientes con agar como agente gelificante en cantidad de 191 g (fortaleza del gel de 560g/cm^2) y carbonato de sodio en cantidad de 2 g. Una vez lograda la uniformidad de la composición y ajustado el pH a 7,1, ésta se envasó en frascos herméticamente cerrados con 15,7 g de la composición.

Paralelamente el $C_3H_8O_2$ se envasó en frascos por 5 mL.

El contenido de cada frasco de la composición se vertió en un erlenmeyer que contenía una mezcla de agua desionizada y el contenido del frasco de $C_3H_8O_2$, se agitó, dejándola remojar por 10 minutos, se procedió a ebulir por 3 minutos, se
5 enfrió hasta la temperatura de 45 °C y se distribuyó en placas de Petri. Una vez gelificada la composición, se procedió a evaluar sus características y desempeño. Se evaluó con cepas certificadas la diferenciación de las colonias y la promoción del crecimiento en comparación con el Agar Triptona Soya según la Tabla No.1.

Tabla No. 1 Diferenciación y promoción del crecimiento a las 24 horas

Organismo	Cepa ATCC	Características de las colonias aisladas	Medio Experimental UFC/mL	Agar Tript. Soya UFC/mL	Dif. signif. $p \leq 0,05$
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Color rojo, bordes regulares, tamaño \approx 2-3 mm	$430 \pm 42,4$	$430 \pm 17,6$	-
<i>Escherichia coli</i>	25922	Color azul intenso, bordes regulares \approx 2 mm	$180 \pm 21,2$	$200 \pm 10,6$	-
<i>Citrobacter freundii</i>	9080	Color violeta, bordes regulares \approx 2 mm	$320 \pm 98,9$	$370 \pm 3,5$	-

10 Experimental: Composición descrita en la presente invención.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por cada mL de dilución 10^{-6}

+ Existen diferencias significativas para $p \leq 0,05$

- No existen diferencias significativas para $p \leq 0,05$

Se inoculó una dilución 10^{-1} de una cepa de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212
15 la cual estuvo inhibida a las 24 horas.

No se observó difusión de la coloración de las colonias al medio, lo que permitió la fácil enumeración y diferenciación de las colonias. Se logró una enumeración y diferenciación temprana de fermentadores tardíos de lactosa como *Citrobacter*. La promoción del crecimiento de las especies ensayadas es comparable con un
20 medio de propósito general como es el caso del Agar Triptona Soya, lo cual se demostró estadísticamente no existiendo diferencias significativas entre los

recuentos obtenidos en ambos medios. La inhibición de las especies Gram-positivas es observada aún a altas concentraciones de inóculo.

A continuación se procedió a la evaluación de la nueva composición en comparación con otras tomadas como referencia, estas fueron:

- 5 Agar Verde Brillante (AVB): Preparado a una concentración de 50 g/L de agua desionizada, agitando la mezcla, la cual se hirvió hasta disolución completa. Se esterilizó a 121 °C, durante 15 minutos, se enfrió hasta 45-50 °C y se distribuyó en placas.

- 10 Agar Rambach (AR): Se vertió el contenido de un frasco (para preparar 1 L), en 1 L de mezcla de suplemento líquido con agua desionizada, se agitó y calentó con agitación hasta ebullición, se enfrió hasta 45-50 °C y se distribuyó en placas.

Agar Violeta Rojo Bilis (AVRB): Preparado a una concentración de 38,5 g/L de agua desionizada, se agitó y calentó con agitación hasta ebullición, se enfrió hasta 45-50 °C y se distribuyó en placas.

- 15 Según se muestra en la Tabla No. 2, además del comportamiento de los microorganismos en el medio, se comparó la promoción del crecimiento a una dilución 10-6 de cada inóculo.

Tabla No.2 Evaluación del comportamiento de diferentes microorganismos en la composición propuesta para crecimiento y diferenciación de *Salmonella*
20 (incubados a 37 °C por 24 h)

Organismo	Medio	Características y color de las colonias aisladas	Promoción del crecimiento	
			UFC/mL	Dif. signif. $p \leq 0,05$
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	AVB	Rosadas, bordes regulares, tamaño ≤ 1 mm	$15 \pm 7,6$	-
	AR	Rojo violetas, bordes regulares, tamaño $\approx 1-2$ mm	$100 \pm 40,0$	
	Experim.	Rojo, bordes regulares, tamaño $\approx 1-2$ mm	$130 \pm 74,0$	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	AVB	Rosadas, bordes regulares, tamaño ≤ 1 mm	$50 \pm 36,5$	-

	AR	Rojo violetas, bordes regulares, tamaño \approx 1-2 mm	260 \pm 201,5	
	Experim.	Rojo, bordes regulares, tamaño \approx 1-2 mm	220 \pm 138,0	
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	AVB	No crecimiento	No crecimiento	+
	AR	No crecimiento	No crecimiento	
	Experim.	Incoloras, bordes regulares, tamaño \approx 2 mm	130 \pm 28,7	
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	AVB	No crecimiento	No crecimiento	+
	AR	No crecimiento	No crecimiento	
	Experim.	Incoloras arosadas, bordes regulares, tamaño \approx 2 mm	225 \pm 28,0	

Experimental: Composición descrita en la presente invención.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por cada mL de dilución 10 -6

+ Existen diferencias significativas para $p \leq 0,05$

- No existen diferencias significativas para $p \leq 0,05$

- 5 En el medio se observa el crecimiento de *Proteus vulgaris* a altas diluciones, se demuestra el crecimiento diferenciado de especies de *Salmonella no typhi* con coloración de rosado intenso a roja de las colonias, bien diferenciadas de la cepa de *Salmonella typhi*. Esta última crece sin inhibición en la composición, incluso a altas diluciones.
- 10 Se inocularon además tres cepas de organismos pertenecientes al grupo coliformes en la composición, utilizando como referencia el medio tradicional Agar Violeta Rojo Bilis, y el Agar Rambach, el crecimiento y características de las colonias se muestran en la Tabla No.3.

Tabla No.3 Evaluación del comportamiento de diferentes microorganismos del grupo coliformes en la composición.

Organismo	Medio	Características y color de las colonias	Promoción del crecimiento
-----------	-------	---	---------------------------

		aisladas	UFC/mL	Dif. signif. $p \leq 0,05$
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	AVRB	Rosadas, bordes regulares, tamaño ≈ 2 mm	$350 \pm 130,5$	-
	AR	No crecimiento	No crecimiento	
	Experim.	Azul verdes, bordes regulares, tamaño $\approx 2-3$ mm	60 ± 19	
Escherichia coli ATCC 25922	AVRB	Rojas con precipitado biliar, bordes regulares, tamaño ≈ 3 mm	395 ± 116	-
	AR	Azul oscuro, con halo azul en el medio, bordes regulares ≈ 2 mm	135 ± 115	
	Experim	Azul verdes, bordes regulares, tamaño $\approx 2-3$ mm	270 ± 43	
Citrobacter freundii ATCC 9080	AVRB	Grises, bordes regulares, tamaño ≈ 2 mm	765 ± 328	-
	AR	Rojo marrón, bordes regulares, tamaño $\approx 1-2$ mm	305 ± 20	
	Experim	Rosado-violeta intenso, bordes regulares, tamaño ≈ 2 mm	$460 \pm 7,5$	

Experimental: Composición descrita en la presente invención.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por cada mL de dilución 10^{-6}

+ Existen diferencias significativas para $p \leq 0,05$

- No existen diferencias significativas para $p \leq 0,05$

- 5 La promoción del crecimiento de los microorganismos coliformes ensayados fue similar estadísticamente al medio tradicional Agar Violeta Rojo Bilis y superior al Agar Rambach para el caso de *Enterobacter aerogenes*. Se logró una diferenciación de este grupo (coliformes) por su color azul-verde característico, diferenciándose la especie de *Citrobacter* por su color violeta, lo que no se logra
- 10 en medios tradicionales basados en la fermentación de la lactosa, por ser este

organismo fermentador tardío.

Se evaluó la composición con cepas certificadas disminuyendo el tiempo de incubación hasta 18 horas, según se muestra en la Tabla No.4.

Tabla No.4. Características del crecimiento y las colonias a las 18 horas

Organismo	Cepa	Características de las colonias
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	Transparentes, bordes regulares, pequeñas \leq 1 mm
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430	Rosadas, bordes regulares, brillantes. Se diferencian de las demás y de <i>Salmonella no typhi</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Rojas, bordes regulares
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	Transparentes, bordes regulares, pequeñas
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Inhibido
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Verdes, bordes regulares, brillantes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Naranja claras, centro más oscuro, bordes regulares, aspecto grasoso
<i>Citrobacter diversus</i>	sp.	Violetas, bordes regulares y transparentes, centro más oscuro
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	Violetas, bordes regulares, diferentes de <i>E. coli</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	Verde azulosas, bordes regulares, se diferencian de <i>E. coli</i> (más claras)

5

Se destaca que ya a las 18 horas hay una buena diferenciación, sin enriquecimiento. La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se pudo identificar, así como, la cepa de *Klebsiella* y *Citrobacter*. El *Staphylococcus aureus* se encuentra totalmente inhibido en el medio.

- 10 La composición fue evaluada además en muestras de pollo contaminadas con *Salmonella*. Dicha muestra se colocó en pedazos dentro de una bolsa de polietileno y se le adicionó agua de peptona buferada en igual cantidad (360 g), se agitó el contenido, y de ahí se tomó el inóculo del cual se prepararon diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Se inoculó la superficie de dos placas, una con
- 15 la más concentrada y otra con la de menor concentración. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los resultados se observan en la Tabla No. 5.

Tabla No. 5. Características del crecimiento y las colonias a las 24 horas de incubación.

Características de las colonias observadas	Identificación según la nueva composición
Colonias rojas, bordes regulares, centro más oscuro, tamaño \approx 2 mm	<i>Salmonella</i> sp.
Colonias rojas, bordes irregulares, halo más grande y claro	<i>Salmonella</i> sp.
4 colonias azul verdosas, bordes irregulares	<i>Citrobacter</i> sp.

A las 24 horas hay una buena identificación de *Salmonella* sin necesidad de pre-enriquecimiento, ni enriquecimiento.

Se realizó una evaluación en 20 muestras de alimentos contaminados con *Salmonella* donde se realizó una comparación de diferentes combinaciones de medios de enriquecimiento y medios sólidos tradicionales para la identificación y aislamiento de *Salmonella*, con la inoculación directa de la muestra en la composición experimental y con combinaciones de esta con los caldos de enriquecimiento según se muestra en la Tabla No.6. Los medios utilizados fueron:

Caldo Tetrationato: Preparado por disolución de 46 g del polvo en 1L de agua desionizada, agitando la mezcla hasta homogeneizar el contenido, adicionando una solución de yodo, preparada especialmente para este medio. Se calentó hasta ebullición durante 1 minuto y se distribuyó en tubos en cantidades de 10 mL.

Medio RAMBACH: Se vertió el contenido de un frasco (para preparar 1 L), en 1 L de mezcla de suplemento líquido con agua desionizada, se agitó y calentó con agitación hasta ebullición, se enfrió hasta 45-50 °C y se distribuyó en placas.

Agar Entérico de Hektoen: Preparado a una concentración de 75,5 g/L de agua desionizada, se agitó y calentó con agitación hasta ebullición (1-3 minutos), se enfrió hasta 45-50 °C y se distribuyó en placas.

Caldo Rappaport Vassiliadis: Preparado a una concentración de 30 g/L de agua desionizada. Una vez preparado es calentado bajo agitación hasta ebullición (1-3 minutos), esterilizado mediante autoclave a 121 °C por 15 minutos y enfriado hasta 45-50 °C y distribuido en tubos.

Tabla No. 6 Comparación con los medios y métodos tradicionales para aislamiento e identificación de *Salmonella*

Metodología	Resultados falsos positivos	Resultados positivos confirmados
Tradicional (TT/HE)	11	0
Tradicional (TT/RAM)	9	1
TT/EXPERIMENTAL	7	0
Tradicional (RV/HE)	4	2
Tradicional (RV/RAM)	4	2
RV/EXPERIMENTAL	2	1
EXPERIMENTAL (directo sin enriquecimiento)	0	0

TT: Caldo Tetrationato

HE: Agar Entérico de Hektoen

5 RV: Caldo Rappaport Vassiliadis

RAM: Medio RAMBACH

Se observa en todos los casos un número de resultados falsos positivos mucho menor en la composición experimental que en los métodos tradicionales, siendo superior el resultado en el caso de la inoculación directa en la composición experimental, donde no se obtuvo ningún resultado falso positivo.

Ejemplo No.2.

Se preparó la composición con los ingredientes según el ejemplo 1 pero pesados por separado en el laboratorio dentro de un erlenmeyer. Se adicionó además el aminoácido sulfurado L-cistina en cantidad de 0,2 g/L.

15 Se añadió a la mezcla de ingredientes sólidos una mezcla de agua desionizada con $C_3H_8O_2$ y se procedió a la preparación de la composición hasta su gelificación según se describe en el ejemplo 1.

Se inocularon cepas certificadas de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Citrobacter freundii* (ATCC 9080) y *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212). Dichas cepas se inocularon por estrías en la superficie del gel, hasta lograr colonias aisladas.

Se logró a las 24 horas una coloración roja intensa en las colonias de *Salmonella* lo que las hace fácilmente diferenciables desde las 21 horas. La cepa de *E. coli* mostró coloración azul-verde, siendo diferente del otro coliforme inoculado (*Citrobacter freundii*), el cual se observó con coloración violeta característica. Fue

evidente la inhibición de la cepa de *Streptococcus faecalis*, la cual no mostró crecimiento en ninguna variante, aún con inóculo concentrado en dilución 10^{-1} .

Ejemplo No.3

Se preparó la composición con los ingredientes según el ejemplo 1, con la
5 diferencia de que el hidrolizado de corazón utilizado fue obtenido por hidrólisis
papaínica (nitrógeno total $\approx 12\%$), la cantidad utilizada fue similar al ejemplo 1.
Otra diferencia radica en que el inhibidor utilizado fue el desoxicolato de sodio, a
concentración de 1 g/L y el sustrato cromogénico fue x-Gal, disminuido en un 33
% respecto a la cantidad utilizada en el ejemplo 1.

10 Estos ingredientes fueron pesados por separado en un erlenmeyer.

Se añadió a la mezcla de ingredientes sólidos, una mezcla de agua desionizada
con $C_3H_8O_2$ y se procedió a la preparación de la composición hasta su gelificación
según se describe en el ejemplo 1.

Se inocularon cepas certificadas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella*
15 *typhimurium* (ATCC 14028), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Salmonella*
enteritidis (ATCC 13076), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Salmonella*
typhi (ATCC 19430) y *Proteus mirabilis* (ATCC 7002). Dichas cepas se inocularon
estriando la superficie hasta obtener colonias aisladas. Los resultados de la Tabla
No. 7, evidencian la diferenciación de las especies inoculadas a las 18 horas de
20 incubación.

Tabla No. 7 Características del medio y las colonias a las 18 horas de incubación.

Organismo	Color del medio	Color y características de las colonias aisladas
<i>Escherichia coli</i>	Naranja	Azules, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 2 mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	Naranja rojizo	Rojo-naranja, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 1,5 - 2 mm
<i>Proteus vulgaris</i>	Naranja	Algo inhibidas, incoloras, bordes regulares, tamaño \approx 1,5 mm
<i>Salmonella enteritidis</i>	Naranja rojizo	Rojo-naranja, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 1,3 mm
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Naranja	Azul claro, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 2 mm
<i>Salmonella typhi</i>	Naranja	Incoloras, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 1,5 mm
<i>Proteus mirabilis</i>	Naranja	Incoloras, bordes regulares, tamaño \approx 1,5 mm

Se observó un crecimiento temprano y diferenciado de las especies de *Salmonella no typhi* por la coloración rosado intenso, siendo la cepa de *Salmonella typhi* incolora en el medio y más pequeña en tamaño. Se observó el crecimiento de las especies de *Proteus*, lo que evidencia la no inhibición de estos microorganismos a diferencia de la mayoría de los medios para diferenciación de *Salmonella*.

Ejemplo No. 4.

La composición fue preparada con los ingredientes según el ejemplo 3, con la adición de yema de huevo deshidratada en cantidades de 4 g/L (V1) y 8 g/L (V2). El método de preparación fue similar al ejemplo 3.

Se inocularon por estrias en la superficie del gel, cepas certificadas de *E. coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi* (ATCC 19430), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) y *Streptococcus faecalis* (ATCC 27212). Los resultados a las 24 horas se observan en la Tabla No. 8.

Tabla No. 8. Funcionalidad de la composición con yema de huevo

Organismo	Variante	Color del medio	Color y morfología de las colonias aisladas
-----------	----------	-----------------	---

<i>Escherichia coli</i>	V1	Naranja, opaco	Azules, bordes regulares, convexas, tamaño ≈ 2 mm
	V2	Naranja, opaco	Azules, bordes regulares, convexas, tamaño ≈ 2 mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	V1	Naranja amarillento, opaco	Rosadas, bordes regulares, convexas, tamaño $\approx 1-2$ mm
	V2	Naranja amarillento, opaco	Rosadas, bordes regulares, convexas, tamaño $\approx 1-2$ 2 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	V1	Rosa-naranja, opaco	Azul-violeta, bordes regulares, convexas, tamaño $\approx 1-2$ mm
	V2	Rosa-naranja, opaco	Azul-violeta, bordes regulares, convexas, tamaño $\approx 1-2$ mm
<i>Salmonella typhi</i>	V1	Naranja, opaco	De incoloras a rosadas, bordes regulares, convexas, tamaño ≈ 1 mm
	V2	Naranja, opaco	De incoloras a rosadas, bordes regulares, convexas, tamaño ≈ 1 mm
<i>Proteus vulgaris</i>	V1	Naranja, opaco	Incoloras, bordes regulares, convexas, tamaño ≈ 1 mm
	V2	Naranja, opaco	Incoloras, bordes regulares, convexas, tamaño ≈ 1 mm
<i>Streptococcus faecalis</i>	V1	Naranja, opaco	Pequeñas colonias muy inhibidas, tamaño $\ll 1$ mm
	V2	Naranja, opaco	Pequeñas colonias muy inhibidas, tamaño $\ll 1$ mm

La composición mostró una gran opacidad en las dos variantes, lo que facilitó un buen contraste para la observación del crecimiento de los microorganismos en la superficie del gel, se observó además una diferenciación de la *Klebsiella pneumoniae* de otros coliformes por su coloración violeta, derivada de la degradación del sustrato cromogénico y la fermentación del $C_3H_8O_2$ en presencia de un indicador de pH. Se observa además un crecimiento de las especies de *Proteus*.

Las especies de *Salmonella* se diferencian a las 24 horas en la composición, mientras que el crecimiento de *Streptococcus faecalis* es imperceptible a las 24

horas.

Ejemplo No. 5.

Se preparó la composición según el ejemplo 3 con la adición de cloruro de magnesio en cantidad de 5 g/L. El método de preparación fue similar al ejemplo 3.

- 5 Se inocularon por estrías en la superficie del gel, cepas certificadas de *E. coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella typhi* (ATCC19430), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Streptococcus faecalis* (ATCC 19433). Se realizó la lectura a las 24 horas, cuyos resultados se muestran en la Tabla No. 9.

- 10 Tabla No. 9 Características del medio y las colonias.

Organismo	Color del medio	Color y características de las colonias aisladas
<i>Escherichia coli</i>	Naranja	Azules, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 2 mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	Naranja rojizo	Rosado, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 2 mm
<i>Salmonella enteritidis</i>	Naranja rojizo	Rosado, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 2 mm
<i>Salmonella typhi</i>	Naranja	Incoloras, bordes regulares, convexas, tamaño \approx 1,5 mm
<i>Streptococcus faecalis</i>	No crecimiento	No crecimiento

- Se observó un buen crecimiento y diferenciación temprana de las especies de *Salmonella no typhi* por su coloración rosada. La cepa de *E. coli* se comportó, según lo esperado, mostrando coloración azul de las colonias aisladas. La cepa
 15 de *Streptococcus faecalis* se mantuvo inhibida en el la composición, evidenciando su poder inhibitorio para los organismos Gram-positivos.

Ejemplo No. 6.

- Se preparó la composición con la adición del compuesto nitrogenado creatina, en cantidad de 0,5 g/L. Los ingredientes fueron pesados por separado en el
 20 laboratorio dentro de un erlenmeyer.

Se añadió a la mezcla de ingredientes sólidos, una mezcla de agua desionizada con $C_3H_8O_2$ y se procedió a la preparación de la composición hasta su gelificación según se describe en el ejemplo 1.

Se evaluó una cepa certificada de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), la cual

se inoculó por estrías sobre la superficie del gel, hasta obtener colonias aisladas.

Se obtuvo a las 24 horas un abundante crecimiento del organismo con coloración rosado fuerte que a las 36 horas se convirtió en rojo intenso, lo que hace posible la incorporación de la creatina en la composición.

5 Ejemplo No. 7.

Se realizó la evaluación de la composición con la formulación según el ejemplo 3 en muestras de alimentos contaminados. Se realizó en paralelo la detección de *Salmonella* en carne contaminada, por el método tradicional y utilizando la nueva composición, sin pre-enriquecimiento.

- 10 Se inocularon directamente diluciones de la muestra en la superficie de la composición por estriado, hasta obtener colonias aisladas. Se detectó en 24 horas la presencia de *Salmonella*, coliformes y otras enterobacterias. Por el método tradicional la muestra se incubó en solución reguladora de peptona (24 horas 37 °C), se enriqueció en Caldo Tetracionato (24 horas a 43 °C) y
- 15 posteriormente se inoculó en Agar Verde Brillante (preparado según ejemplo 1). Debido a esta serie de pasos, el resultado presuntivo para determinar la presencia de *Salmonella* demora de tres a cuatro días.

- A las colonias sospechosas obtenidas por ambos métodos, se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes, inoculándolas por triplicado por el método
- 20 de punción y estrías en los medios para análisis bioquímico (Agar Hierro de Kligler, Agar Urea, Caldo Triptona y para prueba de Indol en Agar Lisina Hierro). Por ambos métodos se confirmó la presencia de *Salmonella*, logrando con la nueva composición una reducción del tiempo total del análisis de, al menos, tres días.

REIVINDICACIONES

1. Composición para la detección y el recuento temprano y diferenciado de organismos microscópicos Gram-negativos, caracterizada por contener una
5 mezcla de sustancias de origen proteico con un contenido de nitrógeno total de 9 a 20 %, la cual se encuentra en la mezcla en una relación de 2:1 a 24:1 con respecto al contenido de sustancias inhibidoras de los organismos Gram-positivos, y que comprende además una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, encontrándose esta mezcla en una relación de 0.5:1 a 2:1 con
10 respecto a la mezcla de sustancias de origen proteico.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla de sustancias de origen proteico contiene hidrolizado pancreático o papaínico de corazón de res, hidrolizado enzimático de proteínas lácteas, autolizados o hidrolizados de origen microbiano y mezcla de proteínas de la yema del huevo.
- 15 3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada porque la mezcla de las sustancias de origen proteico contiene el hidrolizado pancreático o papaínico de corazón de res a una concentración entre 25 y 75 %.
4. Composición según la reivindicación 2, caracterizada porque la mezcla de las sustancias de origen proteico contiene el hidrolizado enzimático de proteínas
20 lácteas está a una concentración hasta el 15% de dicha mezcla.
5. Composición según la reivindicación 2, caracterizada porque la mezcla de las sustancias de origen proteico contiene los autolizados o hidrolizados de origen microbiano a una concentración entre 15 y 25%.
6. Composición según la reivindicación 2, caracterizada porque la mezcla de las
25 sustancias de origen proteico contiene una mezcla de proteínas de la yema del huevo a una concentración de hasta el 45 % de dicha mezcla .
7. Composición según a reivindicación 1 caracterizada porque las sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos Gram-positivos son preferiblemente los ácidos cólico y deoxicólico y sales biliares.
- 30 8. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas comprende óxidos de metales bivalentes y compuestos de silicio; indicadores de pH; alcoholes degradables por

las enzimas de al menos uno de los microorganismos a identificar; compuestos cromogénicos degradables bajo la acción de enzimas de al menos uno de los organismos a identificar, así como sustancias promotoras del crecimiento de los organismos Gram-negativos.

- 5 9. Composición según la reivindicación 8, caracterizada porque, dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, los óxidos de metales bivalentes y compuestos de silicio son preferiblemente el $3\text{MgO} \times 4 \text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ y el $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, los cuales se emplean a una concentración entre 6 al 32 % con respecto a la masa total de la mezcla.
- 10 10. Composición según la reivindicación 8, caracterizado porque dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, los indicadores de pH que se emplean son preferiblemente el rojo fenol y el rojo neutro, los cuales son usados a concentraciones entre 0.03 y 0.18 % con respecto a la masa total de la mezcla.
- 15 11. Composición según la reivindicación 8, caracterizado porque dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, el alcohol degradable por las enzimas de al menos uno de los microorganismos a identificar es preferiblemente el $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$, el cual se emplea en cantidades entre 10 y 14 mL/L.
- 20 12. Composición según la reivindicación 8, caracterizado porque dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, el compuesto cromogénico que puede ser degradado bajo la acción de enzimas de al menos uno de los organismos a identificar es preferiblemente X-Gal, el cual es empleado a concentraciones entre 0,15 y 0.3 % con respecto a la masa total de la mezcla.
- 25 13. Composición según la reivindicación 8, caracterizado porque dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, las sustancias promotoras del crecimiento de los organismos Gram-negativos son preferiblemente sales de sodio y de magnesio, compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y aminoácidos sulfurados.
- 30 14. Composición según la reivindicación 13, caracterizado porque dentro de las sales de sodio y de magnesio se emplean preferiblemente cloruro de magnesio y carbonato de sodio en cantidades desde 0.03 hasta 32 % con respecto a la masa total de la mezcla.
15. Composición según la reivindicación 13, caracterizado porque dentro de la

mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, y particularmente dentro de los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, se emplea preferiblemente la creatina, a concentraciones hasta el 3 % con respecto a la masa total de la mezcla.

16. Composición según la reivindicación 13, caracterizado porque dentro de la mezcla
5 de sustancias orgánicas e inorgánicas, los aminoácidos sulfurados que se emplean son preferiblemente la cistina y la cisteína, en concentraciones hasta el 1.25 % respecto a la masa total de la mezcla.

17. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dentro de la mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas se emplean agentes gelificantes, preferiblemente
10 agar de dureza entre 400 y 700 g/cm² a una concentración entre 40 y 63 % respecto a la masa total de la mezcla.

18. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque posee un valor de pH entre 6,8 y 7,4.

19. Método para preparar la composición de las reivindicaciones de la 1 a la 18,
15 caracterizado porque dicha composición es preparada suspendiendo entre 30 y 32 g de la misma en 1L de una mezcla de alcohol y agua destilada o desionizada, agitando hasta lograr la total distribución, adicionando dicha premezcla a la mezcla de los demás componentes, agitando a temperatura de hasta 100 °C por 1 a 3 minutos la mezcla, disminuyendo la temperatura hasta 45-50 °C, distribuyendo en el envase final de
20 ensayo, dejando solidificar la mezcla a temperatura de 20-30 °C e incubando la mezcla gelificada con los organismos microscópicos o las muestras que los contienen por cualesquiera de los métodos conocidos.

20. Método para la detección y el recuento temprano y diferenciado de microorganismos Gram-negativos caracterizado porque la detección y el recuento de *E. coli* y otros organismos coliformes es posible por el color azul-verde de las colonias
25 sobre fondo naranja del medio; *Salmonella non typhi* por el color rojo del centro de las colonias sobre el fondo rosado del medio; *Salmonella typhi* y *Proteus* por la transparencia de las colonias; *Citrobacter* y *Klebsiella* por la coloración violeta de las colonias sobre fondo rosado a naranja del medio; y *Pseudomonas aeruginosa* por la
30 coloración naranja con centro oscuro de las colonias y pigmentación verdosa a partir de las 24 horas de incubación, las cuales emiten fluorescencia amarillo-verdosa bajo luz ultravioleta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

itud internacional N°

PCT/CU 01/00002

A. CLASIFICACIÓN DE LA INVENCIÓN

CIP 7 C12Q1/04 //(C12Q1/04,C12R1:19,1:22,1:37,1:385,1:42)

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 C12Q C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	ES 2 079 319 A (GARCIA AGUAYO JOSE MARIA) 1 Enero 1996 (1996-01-01) el documento completo	1,2,7,8, 10,12,17
A	WO 96 30543 A (ORION YHTYMA OY) 3 Octubre 1996 (1996-10-03) reivindicaciones 1,3-5,7,9,10,13	1,7,8, 10,12,17
A	US 5 194 374 A (RAMBACH ALAIN) 16 Marzo 1993 (1993-03-16) reivindicaciones 1,5-8	1,7,8, 10-12,17

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

12 Julio 2001

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

08.08.01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Inma Galíndez

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU 01/00002

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2079319 A	01-01-1996	NINGUNO	
WO 9630543 A	03-10-1996	FI 951431 A	25-09-1996
		AU 5006096 A	16-10-1996
		EP 0760866 A	12-03-1997
		JP 2831474 B	02-12-1998
		JP 9511917 T	02-12-1997
		NO 964957 A	21-11-1996
		PL 317322 A	01-04-1997
		US 5786167 A	28-07-1998
US 5194374 A	16-03-1993	FR 2646440 A	02-11-1990
		AT 107963 T	15-07-1994
		DE 69010268 D	04-08-1994
		DE 69010268 T	12-01-1995
		DK 395532 T	25-07-1994
		EP 0395532 A	31-10-1990
		ES 2056401 T	01-10-1994
		FR 2649410 A	11-01-1991
		JP 2995632 B	27-12-1999
		JP 3067599 A	22-03-1991
		US 5098832 A	24-03-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nation on patent family members

International Application No

PCT/CU 01/00002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2079319 A	01-01-1996	NONE	
WO 9630543 A	03-10-1996	FI 951431 A AU 5006096 A EP 0760866 A JP 2831474 B JP 9511917 T NO 964957 A PL 317322 A US 5786167 A	25-09-1996 16-10-1996 12-03-1997 02-12-1998 02-12-1997 21-11-1996 01-04-1997 28-07-1998
US 5194374 A	16-03-1993	FR 2646440 A AT 107963 T DE 69010268 D DE 69010268 T DK 395532 T EP 0395532 A ES 2056401 T FR 2649410 A JP 2995632 B JP 3067599 A US 5098832 A	02-11-1990 15-07-1994 04-08-1994 12-01-1995 25-07-1994 31-10-1990 01-10-1994 11-01-1991 27-12-1999 22-03-1991 24-03-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CJ 01/00002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12Q1/04 //(C12Q1/04, C12R1:19,1:22,1:37,1:385,1:42)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

IPC7: C12Q C12N

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2 079 319 A (GARCIA AGUAYO JOSE MARIA) 3 October 1996 (03.10.96) claims 1, 3-5, 7, 9, 10, 13	1,2,7,8, 10,12,17
A	WO 96 30543 A (ORION YHTYMA OY) 1 January 1996 (01.01.96) see the whole document	1,7,8, 10-12,17
A	US 5 194 374 A (RAMBACH ALAIN) 16 March 1993 (16.03.93) claims 1, 5-8	1,7,8, 10,12,17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 July 2001 (12.07.01)

Date of mailing of the international search report

8 August 2001 (08.08.01)

Name and mailing address of the ISA/CU

S. P. T. O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.